

# 〔報告〕高松塚古墳石室内より分離された主要な微生物のギ酸・酢酸生成能

著者	佐野 千絵, 西島 美由紀, 喜友名 朝彦, 木川 りか, 杉山 純多
雑誌名	保存科学
号	49
ページ	209-219
発行年	2010-03-31
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1440/00003780/">http://id.nii.ac.jp/1440/00003780/</a>

## 〔報告〕 高松塚古墳石室内より分離された主要な 微生物のギ酸・酢酸生成能

佐野 千絵・西島 美由紀\*・喜友名 朝彦\*・木川 りか・杉山 純多\*<sup>2</sup>

高松塚古墳石室内から分離されたカビ・酵母，細菌の各分離株について，壁画の劣化と関わる可能性がある代謝物の生成能調査を進めている<sup>1-7)</sup>。このうち有機酸は，漆喰の溶解や色料の変色を引き起こす可能性があり，その影響の大きさから pH を下げる効果の大きいギ酸・酢酸について優先的に検討が必要である。さらに石室内ではエタノール，イソプロパノール等を消毒に用いていたが，濃度が薄くなると微生物の栄養源となっていた可能性もあり，これらを単一の炭素源としたときにギ酸・酢酸が代謝されてくるか，その生成量についても検討した。比較対照として，キトラ古墳石室内から分離された微生物分離株についても分析をおこなった。

### 1. 定量分析を行うための予備試験

まず分析対象微生物の培養に適しており，かつ培地に含まれる有機酸が分析上の障害とならないよう，適切な合成培地を選択する試験を行った。次に，微生物試料の場合，植種量や植種方法などわずかな培養時の条件の違いによって，生成量に大きな影響があることが予想されたため，同一培養条件内の分析値の標準偏差を求め，分析が有意となるか確認した。

#### 1-1. 方法

##### 1-1-1. 合成培地の選択

培地選択試験には，表1および表2に挙げた菌株のうち，アスタリスク2つを付した株を用いた。

カビ・酵母用の培地には，以下の組成の液体培地を使用した。

ツァベック培地：硝酸ナトリウム 3g，燐酸一水素二カリウム 1g，硫酸マグネシウム七水和物 0.5g，塩化カリウム 0.5g，硫酸鉄 (II) 七水和物 0.01g，スクロース 30g，蒸留水 1000mL pH 6.5

細菌用の培地には，以下の5種類を試験した。

Koser の培地 (改変)：燐酸二水素アンモニウム 1g，燐酸一水素二カリウム 1g，塩化ナトリウム 5g，硫酸マグネシウム七水和物 0.2g，グルコース 2g 蒸留水 1000mL pH 6.8

Davis 培地 (改変)：燐酸一水素二カリウム 7g，燐酸二水素一カリウム 2g，硫酸マグネシウム七水和物 0.15g，硫酸アンモニウム 1g，グルコース 2g，蒸留水 1000mL pH 6.8

ツァベック培地：カビ・酵母用と同じ組成

1/10濃度希釈 Nutrient Broth 培地：nutrient broth (Oxoid, Hampshire, England) 1.3g，蒸留水 1000 mL pH 7.4

0.02%酵母エキス添加 BM 培地：燐酸水素二アンモニウム 1g，塩化カリウム 0.2g，硫酸マグネシウム七水和物 0.2g，酵母エキス 0.2g，グルコース 10g，蒸留水 1000mL pH 7.0

これらの培地に，さらにエタノールを1%添加したものをそれぞれ調製し，各分離株の生育性を比較検討した。各培地における分離株の生育については，濁度等を目視で判定し，生育可能か判断した。

\*テクノスルガ・ラボ(株)NCIMB グループ

\*<sup>2</sup>テクノスルガ・ラボ(株)千葉分室

表1 有機酸分析 供試菌株リスト

種名	菌株番号 <sup>※1</sup>	分離源
カビ		
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 1	T4519-5-1	高松塚古墳 石室内 床面 白色コロニー
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 2	T6713-14-2	高松塚古墳 石室内 西壁 男子群像上部の黒カビ
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 1	T6517-1-1**	高松塚古墳 石室内 西壁 女子 額の黒色部分 No. ①
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 2	K7511-1**	キトラ古墳 石室内 北壁 東側 上方 黒ススカビ
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 3	K4615-9	キトラ古墳 石室内 B区 西壁と流入土の空隙 土壌サンプル3点
<i>Penicillium paneum</i>	T5916-6-1**	高松塚古墳 石室内 東壁 女子群像下 ゲル状
<i>Penicillium paneum</i>	K5916-7-1	キトラ古墳 石室内 北壁 玄武下
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード) <sup>※2</sup>	K5225-19-3**	キトラ古墳 石室内 西 漆喰剥落片
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード) <sup>※2</sup>	T4716-1***	高松塚古墳 石室内 西壁 白虎の爪の箇所 ゲル状 (高松粘菌)
<i>Trichoderma</i> sp. 1-b	T4519-9-7**	高松塚古墳 石室内 東壁
<i>Trichoderma</i> sp. 1-b	K5916-7-3	キトラ古墳 石室内 北壁 玄武下
<i>Cylindrocarpum</i> sp.	TBT-1**	高松塚古墳 石室内 北壁 玄武尾下
<i>Cylindrocarpum</i> sp.	TBK-22	キトラ古墳 石室内 西壁 白虎前足付近 褐色部分
<i>Phialocephala phycomyces</i>	K5906-1-1**	キトラ古墳 石室内 西壁 中央下部 茶とげからの分離平板 (MA)
酵母		
<i>Candida takamatsuzukensis</i>	T4922-1-1 <sup>T</sup> **	高松塚古墳 石室内 奥 (B-1: 1a (落下菌: CP 添加 PDA を10分間開放)
<i>Candida tumulicola</i>	T6517-9-5 <sup>T</sup> **	高松塚古墳 石室内 東壁 右女子足元下 ゲル状部分 No. ⑨
<i>Candida</i> sp.	K5916-7-4**	キトラ古墳 石室内 北壁 玄武下
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3**	高松塚古墳 石室内 西壁 白虎の爪の箇所 ゲル状 (高松粘菌)
<i>Pichia guilliermondii</i>	T6517-3-4**	高松塚古墳 石室内 西壁 左女子 頭部後方の黒色部分 No. ③
細菌		
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	T5916-2-1b**	高松塚古墳 石室内 西壁 白虎 後肢下 ゲル上
<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> に近縁)	K5916-3-1b	キトラ古墳 石室内 南壁 朱雀上のカビ
<i>Ochrobactrum</i> sp. ( <i>O. grignonense</i> に近縁)	T6220-2-3b**	高松塚古墳 石室内 西壁 女子群像 頭上
<i>Bacillus simplex</i>	K6203-10-3b**	キトラ古墳 石室内 南壁 下方 ゲル上の塊多数 (高松塚のものに酷似)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	T5916-8-1b**	高松塚古墳 石室内 東壁 青龍左 茶しみ中の黒カビ跡 ベタベタ状
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-2-1b**	キトラ古墳 石室内 西寄り天井 漆喰にあいた穴② No.4中身の黒色
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-1-1b	キトラ古墳 石室内 西寄り天井 漆喰にあいた穴② No.3 (黒色物質)
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-3-1b	キトラ古墳 石室内 西寄り天井 漆喰にあいた穴③ No.5 表層の黒色 (黒色物質)
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 2	K8617-1-1b	キトラ古墳 石室内 天井石 北東側隅付近 茶ゲル
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K8617-3-4b	キトラ古墳 石室内 東壁 中央上部付近 白粒状
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K8617-7-3b	キトラ古墳 石室内 床面 南側 水色

※1 T: 高松塚古墳分離株, K: キトラ古墳分離株, TBT: 高松塚古墳分離株 (東文研), TBK: キトラ古墳分離株 (東文研), T (上付 T): 基準株, \*\*予備試験供試株

※2 *Fusarium* sp. (FSSC クレード): *Fusarium solani* species complex クレードに含まれる *Fusarium* sp.

表2 有機酸分析 対照菌株リスト

種名	菌株番号 <sup>※3</sup>	分離源
<i>Acremonium masseei</i>	CBS 794.69	ウサギの糞 (イタリア)
<i>Acremonium murorum</i> var. <i>murorum</i>	CBS 148.81	森林土壌 (ジョージア州, アメリカ)
<i>Penicillium paneum</i>	CBS 101032 <sup>T</sup>	カビの生えたパン (デンマーク)
<i>Fusarium solani</i> fsp. <i>mori</i>	NBRC 30964	クワ <i>Morus bombycis</i> (宮崎県, 日本)
<i>Trichoderma harzianum</i>	NBRC 30543	材木 (アメリカトガサワラ (ベイマツ douglas fir)) (産地不明)
<i>Aspergillus niger</i> <sup>※1</sup>	JCM 22282	分離源不明
<i>Ustilago cynodontis</i> <sup>※2</sup>	NBRC 7530	分離源不明
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 <sup>T</sup>	さとうきび
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	DSM 12717 <sup>T</sup> **	さとうきび さとうきびに寄生する昆虫
<i>Bacillus thuringiensis</i>	JCM 20386 <sup>T</sup> **	蛾
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NBRC 14161 <sup>T</sup> **	口腔がん患者の口腔咽頭部

※1 有機酸 (クエン酸) 生成対照菌株

※2 有機酸 (イタコン酸) 生成対照菌株

※3 T (上付 T): 基準株, CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures 保存株, NBRC: NITE Biological Resource Center 保存株, JCM: Japan Collection of Microorganisms (RIKEN BioResource Center) 保存株, DSM: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH 保存株 \*\*予備試験供試株

1－1－2. 分析誤差の確認

試験株には、高松塚・キトラ両古墳から分離された *Fusarium* sp. T4716-1 および *Fusarium* sp. K5225-19-3 を用いて、培養によるばらつきを検討した。

PDA 培地で25℃ 1 週間、前培養した両菌株の胞子を回収し、およそ10<sup>6</sup>cells/ml になるように1 %エタノール添加ツアベック培地にそれぞれ懸濁した。各菌株胞子懸濁液を100μL ずつ1 %エタノール添加ツアベック培地に、10本ずつ植菌し、25℃ 斜面、静置で1 週間培養した。各培養物の上清を回収し、フィルターろ過 (0.22μm のフィルターでろ過後0.45μm マイレクスフィルターでろ過) を行って有機酸分析試料とした。

定量分析は有機酸分析システム (島津製作所製 有機酸分析システム カラムオープン 45℃, 150μL) で行い、有機酸のうち漆喰の劣化に影響の大きいと考えられるギ酸および酢酸の生成量についてまとめた。

1－2. 結果

供試したすべてのカビ・酵母菌株は、ツアベック培地で、エタノールの少量添加の有無に関係なく生育が認められた。

一方、細菌については (表 3)、改変 Koser 培地、改変 Davis 培地およびツアベック培地では生育の良くない菌株が認められたこと、Nutrient Broth は1 /10濃度に希釈しても、定量分析の妨害となる培地中の有機酸量が多いと予想されたことから、定量分析には0.02%酵母エキス添加 BM 培地が望ましいと判断した。

定量用にあつらえた基準試料の標準偏差は平均値に対して0.3%であった。10本植菌した試料間の誤差は、高松塚分離株 *Fusarium* sp. T4716-1 でギ酸1.64±0.59mg/L (標準偏差 35.8%), 酢酸117.56±36.78mg/L (標準偏差 31.3%), キトラ分離株 *Fusarium* sp. K5225-19-3 でギ酸1.52±0.66mg/L (標準偏差 43.8%), 酢酸117.89±25.36mg/L (標準偏差 21.5%) といずれも培養条件による影響は大きく、生成量を比較検討する際には十分に注意が必要であるが、同一回の培養の内では生成量の多少について有意の差を得られると判断した。

表3 各種培地における細菌分離株の生育性

菌種名	菌株番号*	改変 koser 培地		改変 Davis 培地		ツアベック 培地		1/10Nutrient Broth 培地		0.02%酵母エキス 添加 BM 培地	
		EtOH 添加	EtOH 無添加	EtOH 添加	EtOH 無添加	EtOH 添加	EtOH 無添加	EtOH 添加	EtOH 無添加	EtOH 添加	EtOH 無添加
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	T5916-2-1b	+W	+W	+W	+W	+W	－	++	++	++	++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NBRC 14161 <sup>T</sup>	+	+W	+W	+W	+W	+W	+	+	+	++
<i>Ochrobactrum</i> sp. ( <i>O. grignonense</i> に近縁)	T6220-2-3b	++	++	+	+	+W	+W	+	++	+	++
<i>Bacillus thuringiensis</i>	T5916-8-1b	+	+W	－	－	+W	+W	++	++	+	++
<i>Bacillus thuringiensis</i>	JCM 20386 <sup>T</sup>	+	+W	+W	+	+W	－	++	++	+	++
<i>Bacillus simplex</i>	K6203-10-3b	++	++	++	++	++	+	+	+W	+	++
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-2-1b	+	++	+	++	+	+	++	+	++	+
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	DSM 12717 <sup>T</sup>	++	++	+	+	++	+	+	+W	+	++

+ 良好に生育, ++ 非常に良い生育, +W わずかに生育, - 生育が認められない  
EtOH は濃度1 %になるように添加  
\*表1・表2 脚注参照

以下、2～4で報告する試験は、各項目内で同一回の培養での試験結果であり各項目内でのみ比較検討に用いることができるが、2～4の各項目で得られた数値同士を比較検討できないので注意されたい。

## 2. 主要な分離株の有機酸生成量

### 2-1. 方法

試験に用いた菌株のリストを表1および表2に示す。使用培地は、予備試験で選択した通り、カビ・酵母用にはツァベック液体培地、細菌用には0.02%酵母エキス添加BM液体培地とした。

カビは斜面静置6日または7日、酵母・細菌は振とう培養3日または4日、25℃で培養した。培養本数は各2本（反復）、植菌量はカビについては平板培地上のコロニー先端部をコルクボーラーで切り取って、接種源とした。細菌および酵母については懸濁液を作製し、0.5mLずつ添加した。

有機酸分析用の各試料は、先述のとおり、ろ過後の培養上清を試料として有機酸分析システムで測定した。

また、測定対象としたギ酸・酢酸以外の要因によるpH低下を把握するため、ろ過後の培養上清のpHを測定し（EUTECH INSTRUMENTS社製 pHメーター EcoScan pH 5）、培地のpH変化を比較検討した。

さらに、培養期間の違いによる培養上清のpH変化も検討した。培養期間を1週間延長したものについてそれぞれpHを測定し（堀場製作所製 コンパクト pHメーター twin pH B-211）、ブランク培地のpHに対する変化量を算出した。

### 2-2. 結果

各分離株のギ酸・酢酸生成量とpH変化量の結果を表4～6に示す。

カビではギ酸の生成は認められなかった。

高松塚古墳からの微生物分離株では、*Fusarium* 属分離株およびその近縁対照株で顕著な酢酸生成が認められた。次いで *Acremonium* 属 (*Gliomastix* 節) 分離株で比較的酢酸の生成が多く見られたが、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属などの分離株や保存株では酢酸の生成はほとんど認められなかった。酵母では *Pichia membranifaciens* 分離株 T4716-3で顕著な酢酸生成が認められた。細菌では *Ochrobactrum* 属分離株 T6220-2-3bで酢酸の生成およびpHの低下が認められた。

比較対照として分析をおこなったキトラ古墳石室内から分離された微生物分離株では、西寄り天井の漆喰にあいた穴の中の黒色物質から分離された *Gluconacetobacter* sp. (K5929-2-1b株) の酢酸生成量が多く、pHの変化量も大きかった。この分離株が漆喰を溶かした要因菌の一つと考えられる。

分離株培養液は概ね酢酸生成量の多い株で顕著にpHの低下が認められる傾向があった。しかし、*Phialocephala phycomyces* では酢酸生成量は検出限界以下であるにもかかわらずpHが低下しており、その他の株でも詳細に見るとpH低下の程度は必ずしも酢酸生成量のみとは相関しない場合もあった。この理由としては、培地中の窒素源からアルカリ性物質（アンモニア等）を産生する株では中和される場合がある可能性や、酢酸以外の酸の生成によってpHが低下する場合などが推測される。*P. phycomyces* 培養上清および培地（参照試料）上清についてのみ、イオンクロマトグラフ（横河 HP 製 HP2010-II）で無機イオン分析を行ったが、この2試料で無機イオン量について有意の差はみとめられなかった。

表4 カビ分離株による酢酸生成量と培養液の pH 変化量

種名	菌株*	酢酸生成量 mg/L	pH 変化量**
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 1	T4519-5-1	48	-0.55
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 2	T6713-14-2	14	-0.09
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 2	K7511-1	11	0.17
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) <i>murorum</i> var. <i>murorum</i>	CBS 148.81	31	-0.09
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 1	T6517-1-1	39	-0.32
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) <i>masseei</i>	CBS 794.69	13	0.19
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i> ) sp. 3	K4615-9	20	-0.08
<i>Penicillium paneum</i>	T5916-6-1	検出限界以下	0.31
<i>Penicillium paneum</i>	CBS 101032 <sup>T</sup>	検出限界以下	0.11
<i>Penicillium paneum</i>	K5916-7-1	検出限界以下	0.33
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)***	T4716-1	130	-1.63
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>mori</i>	NBRC 30964	57	-0.81
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)***	K5225-19-3	91	-0.90
<i>Trichoderma</i> sp. 1-b	T4519-9-7	24	-0.35
<i>Trichoderma</i> sp. 1-b	K5916-7-3	0.3	0.32
<i>Trichoderma harzianum</i>	NBRC 30543	13	0.24
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	TBT-1	26	-0.60
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	TBK-22	21	-0.36
<i>Phialocephala phycomyces</i>	K5906-1-1	検出限界以下	-1.99

\*, \*\*\*表1・表2 脚注参照

\*\* pH 変化量 = 培養後の培養液 pH 測定値 - ブランク培地の pH 測定値

表5 酵母分離株のギ酸および酢酸生成量と培養液の pH 変化量

種名	菌株*	ギ酸生成量 mg/L	酢酸生成量 mg/L	pH 変化量**
<i>Candida takamatsuzukensis</i>	T4922-1-1 <sup>T</sup>	1.6	0	0.01
<i>Candida tumulicola</i>	T6517-9-5 <sup>T</sup>	0.4	0	0.04
<i>Candida</i> sp.	K5916-7-4y	0.7	17	-0.44
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	検出限界以下	450	-2.10
<i>Pichia guilliermondii</i>	T6517-3-4	0.4	8.1	-0.12

\*表1・表2 脚注参照, \*\*表4 脚注参照

表6 細菌分離株のギ酸および酢酸生成量と培養液の pH 変化量

種名	菌株*	ギ酸生成量 mg/L	酢酸生成量 mg/L	pH 変化量**
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	T5916-2-1b	検出限界以下	22	-0.21
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NBRC 14161 <sup>T</sup>	検出限界以下	2.2	-0.10
<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> に近縁)	K5916-3-1b	13	43	-0.43
<i>Ochrobactrum</i> sp. ( <i>O. grignonense</i> に近縁)	T6220-2-3b	検出限界以下	57	-1.02
<i>Bacillus thuringiensis</i>	T5916-8-1b	検出限界以下	22	-0.96
<i>Bacillus thuringiensis</i>	JCM 20386 <sup>T</sup>	検出限界以下	11	-1.51
<i>Bacillus simplex</i>	K6203-10-3b	検出限界以下	8.5	-0.46
<i>Gluconacetobacter</i> sp.	K5929-2-1b	検出限界以下	400	-3.58
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 <sup>T</sup>	検出限界以下	74	-3.91

\*表1・表2 脚注参照, \*\*表4 脚注参照

培養期間をさらに2週間延長したものに対し pH 測定を行い、HPLC 分析試料との pH の変化量を比べた。すなわち、各分離株培養上清の pH 平均値を培養期間延長後の pH 測定値から引いたものを変化量とし、結果を図1～図2に示す。HPLC 分析試料(カビ分離株は培養7日、酵母および細菌は培養4日で採取)と比較すると培養期間を延長したものでは全ての分離株で pH の低下が認められた。このことから、培養期間の違いは酸生成量に影響すると考えられる。

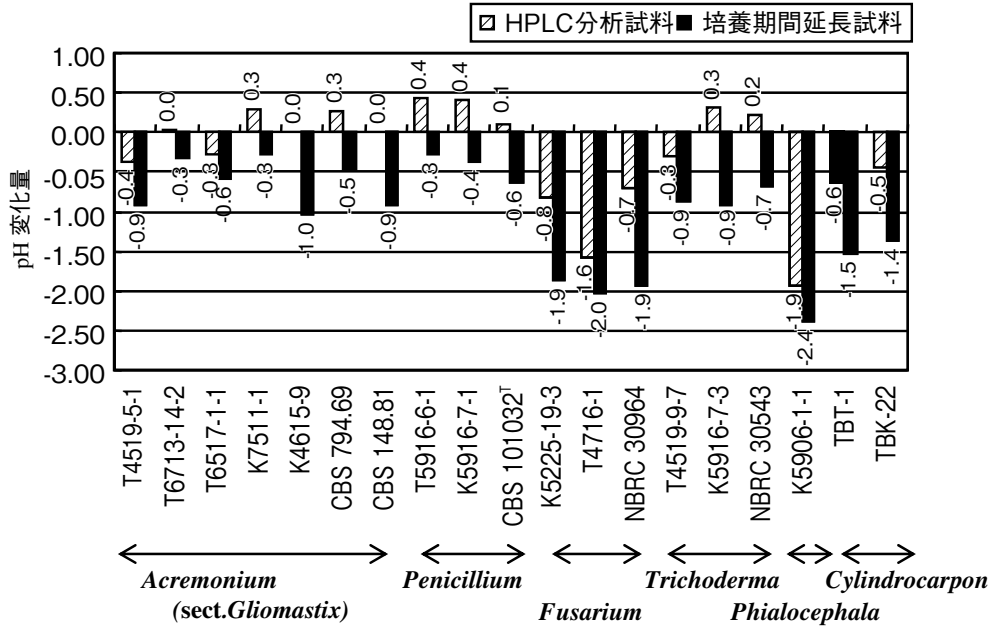


図1 カビ分離株の培養期間を延長したときの pH 変化量 (培養21日目)

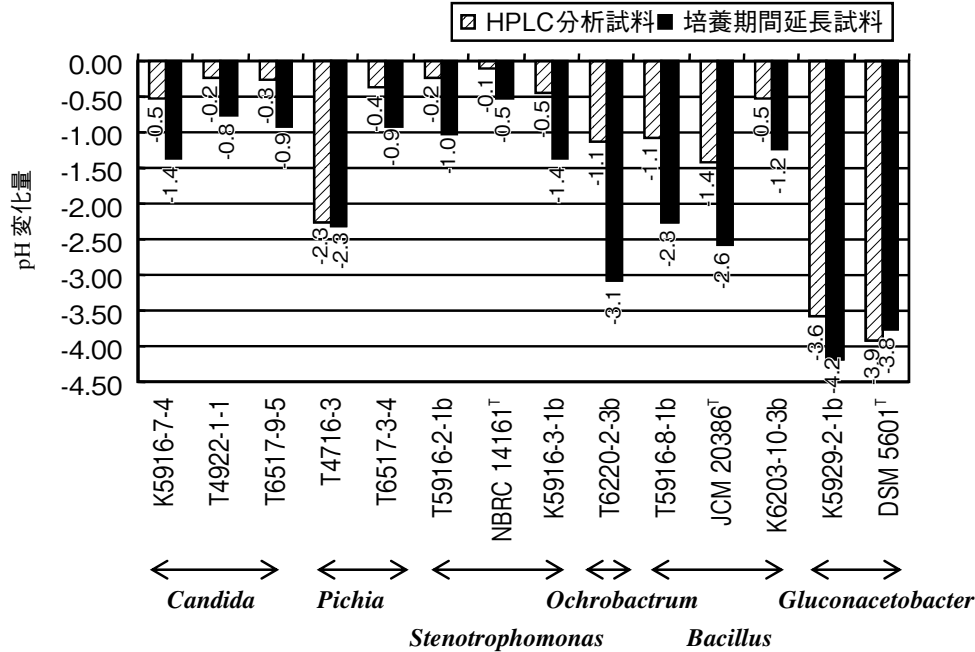


図2 酵母および細菌分離株の培養期間を延長したときの pH 変化量 (培養18日目)

### 3. エタノール, イソプロパノール, グルコースをそれぞれ単一炭素源とした時の酢酸生成量と pH

有機酸生成の顕著な株について, エタノール, イソプロパノール等を単一の炭素源としたときの生成量を比較検討した。グルコースを対照の栄養源とした。

#### 3-1. 方法

試験には, *Fusarium* 属 3 株 (K5225-19-3, T4716-1, および対照菌株 *Fusarium solani* f.sp. *mori* NBRC 30964), 酵母 1 株 (*Pichia membranifaciens* T4716-3), 細菌 2 株 *Ochrobactrum* sp. T6220-2-3b, *Stenotrophomonas* sp. (*S. rhizophila* に近縁) K5916-3-1b, および酢酸菌 2 株 (*Gluconacetobacter* sp. K5929-2-1b, 既知種基準株 *G. diazotrophicus* DSM5601<sup>T</sup>) の 8 株を用いた。

カビ・酵母はツアベック液体培地, 細菌は0.02%酵母エキス添加 BM 液体培地のそれぞれ炭素源 (スクロースあるいはグルコース) を除いたものを基本培地とした。これらの培地に, 最終濃度 1 % となるように, エタノール, イソプロパノール, またはグルコースを添加した。

カビは斜面静置 6 日または 7 日, 酵母・細菌は振とう培養 3 日または 4 日, 25℃ で, 各 2 本 (反復) ずつ培養した。植菌量はカビについては平板培地上のコロニー先端部をコルクボーラーで切り取って接種源とした。細菌および酵母については懸濁液を作製し 0.5mL ずつ添加した。

#### 3-2. 結果

結果を表 7 に示す。ギ酸の生成は, カビ・酵母でエタノールあるいはプロパノールを単一炭素源とした時に認められた。細菌では *Stenotrophomonas* sp. でギ酸生成が見られたが, 酢酸菌ではギ酸生成は確認されなかった。

高松塚古墳から分離された微生物について以下に述べる。*Fusarium* 属株では, グルコースを単一炭素源としたときに酢酸の生成が顕著に認められた (表 8)。一方, 酵母ではエタノールを単一炭素源としたときに顕著な酢酸生成が認められた。細菌ではエタノールを単一炭素源としたときに, *Ochrobactrum* 属分離株で酢酸の生成が顕著に認められた。イソプロパノールを単一炭素源としたときは, 用いたカビ, 酵母, 細菌の各分離株は生育も不良であった。

キトラ古墳から分離された 酢酸菌では, エタノールを単一炭素源としたときに, 酢酸の生成が顕著に認められた。酢酸菌はグルコースを単一炭素源としたとき, 良好な生育が認められたものの, 酢酸の生成量は検出限界以下であった。分離株の帰属する *Gluconacetobacter* 属細菌には酢酸のほか, グルコン酸生成能のある株が知られていることから, グルコースを単一炭

表 7 単一炭素源を変えた時のギ酸生成量の相違

種名	菌株*	グルコース	エタノール	イソプロパノール
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)**	T4716-1	検出限界以下	1.6	0.6
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)**	K5225-19-3	検出限界以下	1.7	0.3
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>mori</i>	NBRC 30964	検出限界以下	1.4	検出限界以下
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	検出限界以下	0.4	1.3
<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> に近縁)	K5916-3-1b	1.6	検出限界以下	1.2
<i>Ochrobactrum</i> sp.	T6220-2-3b	検出限界以下	0.1	0.10
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-2-1b	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 <sup>T</sup>	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下

表中数値単位 mg/L, \*, \*\*表 1・表 2 脚注参照



表8 単一炭素源を変えた時の酢酸生成量の相違

種名	菌株*	グルコース	エタノール	イソプロパノール
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)**	T4716-1	89	3.3	0.3
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)**	K5225-19-3	24	4.8	1.3
<i>Fusarium solani</i> f. sp. mori	NBRC 30964	49	3.4	0.6
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	24	180	1.6
<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> に近縁)	K5916-3-1b	8.1	検出限界以下	1.2
<i>Ochrobactrum</i> sp.	T6220-2-3b	3.4	52	検出限界以下
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-2-1b	検出限界以下	1700	検出限界以下
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 <sup>T</sup>	23	320	0.2

表中数値単位 mg/L, \*, \*\*表1・表2 脚注参照

表9 単一炭素源を変えた時の pH の変化量\*

種名	菌株**	グルコース	エタノール	イソプロパノール
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)***	T4716-1	-1.63	0.34	0.24
<i>Fusarium</i> sp. (FSSC クレード)***	K5225-19-3	-0.16	0.52	0.29
<i>Fusarium solani</i> f. sp. mori	NBRC 30964	-0.94	0.28	0.15
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	-0.34	-1.89	0.04
<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> に近縁)	K5916-3-1b	-0.28	0.06	0.17
<i>Ochrobactrum</i> sp.	T6220-2-3b	-1.29	-0.73	0.16
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-2-1b	-3.66	-3.23	0.04
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 <sup>T</sup>	-3.97	-2.13	0.05

\*表4 脚注参照 表中数値単位 mg/L, \*\*, \*\*\*表1・表2 脚注参照

素源としたときは酢酸ではなく、グルコン酸を生成した可能性が考えられ、これによる培地 pH の低下が生じたことが推察された。

培地の pH は、酸生成の多いもので顕著な低下が認められた。

## 4. 酢酸菌の酢酸生成能の比較検討

キトラ古墳石室内からはこれまでに6株の酢酸菌が分離されているが、これらの酢酸生成能についても分離株ごとにどの程度の異なりがあるのか検討した。

### 4-1. 方法

使用した菌株は表1：K5929-2-1b および K5929-1-1b～K8617-7-3b である。対照として分離株の既知近縁種である *Gluconacetobacter diazotrophicus* を用いた。培地は0.02%酵母エキス添加 BM+1% EtOH 培地を用い、培養時間3日、25℃で振とう培養した。培養は各2本（反復）、植菌は懸濁液を作製し0.5mL ずつ添加した。

### 4-2. 結果

分離株では対照に用いた *Gluconacetobacter diazotrophicus* よりも多くの酢酸生成が認められた。また、培地 pH も大きく低下した。酢酸生成量で見ると平均値に対して変動幅は約90%となり、分離株ごとに酢酸生成能力はかなりのばらつきがあったものの、pH 変化量はいずれも大きく、漆喰の溶解という事象を引き起こす能力を十分に持つ菌株であることが明確になった。

表10 キトラ古墳酢酸菌分離株の酢酸生成量と pH 変化量

種名	菌株*	酢酸生成量 mg/L	pH 変化量**
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-1-1b	2200	- 3.30
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5919-2-1b	640	- 3.85
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K5929-3-1b	1600	- 3.65
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 2	K8617-1-1b	170	- 3.30
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K86173-4b	510	- 3.19
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	K8617-7-3b	370	- 3.17
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM5601 <sup>T</sup>	90	- 3.38

\*, \*\*表1・表2 脚注参照

## 5. まとめ

高松塚古墳から、また参照試料としてキトラ古墳から分離されたカビ、酵母、細菌の各分離株について、特に漆喰の劣化と関わる可能性があるギ酸・酢酸生成量および pH 低下、さらにエタノール、イソプロパノール等を単一の炭素源としたときの酢酸生成量について比較検討した。

高松塚古墳微生物分離株のうち、カビでは *Fusarium* sp. (T4716-1 株)、酵母では *Pichia membranifaciens* (T4716-3 株)、細菌では *Ochrobactrum* sp. (T6220-2-3b 株) で酢酸生成量の多いものが存在し、pH の低下も引き起こす可能性が示された。比較対照として分析をおこなったキトラ古墳石室内から分離された微生物分離株では、西寄り天井の漆喰にあいた穴の中の黒色物質から分離された *Gluconacetobacter* sp. (K5929-2-1b 株) の酢酸生成量が多く、pH の変化量も大きかった。この分離株が漆喰を溶かした要因菌の一つと考えられる。培養期間を延長したものでは全ての分離株で pH の低下が認められた。

単一炭素源を希少量のエタノールに変えると、高松塚古墳石室内微生物分離株では *Pichia membranifaciens* (T4716-3 株)、*Ochrobactrum* sp. (T6220-2-3b 株) で酢酸生成量が増加し、pH 低下を引き起こす可能性があることがわかった。キトラ古墳石室内からの微生物分離株では、*Gluconacetobacter* sp. (K5929-2-1b 株) の酢酸生成量が多かった。

キトラ古墳石室内から分離された6株の酢酸菌の酢酸生成能力には、かなりのばらつきがあったもののいずれの株も pH 変化量は大きく、漆喰の溶解という事象を引き起こす能力を十分に持つ菌株であることが明らかとなった。

以上の結果から、高松塚古墳石室内では酵母 *Pichia membranifaciens* (T4716-3 株) が、キトラ古墳石室内では分離された酢酸菌はいずれも大きな pH 低下を引き起こし、壁画劣化に関与したおそれがあると考えられた。また、漆喰に孔があくほどの目に見える被害はなくとも、微生物が繁殖した壁面は酢酸等の生成物で汚損され、漆喰表面 pH の低下を引き起こして次の微生物被害を被りやすい状態となることがわかった。殺菌薬に用いられたエタノールは、1%と薄い濃度になると微生物の栄養となり得ることがわかった。長期に現地保存が期待される文化遺産については、殺菌や除菌にあたって、可能であれば将来えさになり得る有機質の薬剤を避け、紫外線殺菌などその他の物理的方法の採用も検討すべきであることが示唆された。

キーワード：高松塚古墳 (Takamatsuzuka tumulus)；キトラ古墳 (Kitora tumulus)；微生物 (microorganisms)；有機酸生成 (carboxylic acid production)

## 参考文献

- 1) 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会（第10回）資料5-2 高松塚古墳石室内より分離された主要な微生物の酢酸生成能調査結果, 2009年9月1日
- 2) 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会（第11回）資料4 高松塚古墳石室内菌類調査, 2009年11月30日
- 3) Rika Kigawa, Chie Sano, Takeshi Ishizaki, Sadatoshi Miura and Junta Sugiyama: Biological issues in the conservation of mural paintings of Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan, Proceedings of the International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property 2008: "Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures," National Research Institute for Cultural Property, Tokyo, pp.43-50, (2009)
- 4) Junta Sugiyama, Tomohiko Kiyuna, Kwqang-Deug An, Yuka Nagatsuka, Yutaka Handa, Nozomi Tazato, Junko Hata-Tomia, Miyuki Nishijima, Tomomi Koide, Yukio Yaguchi, Rika Kigawa, Chie Sano and Sadatoshi Miura: Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka and Kitora Tumuli, Nara Prefecture, Japan: a milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings, Proceedings of the International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property 2008: "Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures," National Research Institute for Cultural Property, Tokyo, pp.51-73, (2009)
- 5) Tomohiko Kiyuna, Kwang-Deuk An, Rika Kigawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, and Junta Sugiyama: Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*, Mycoscience, 49, 298-311 (2008)
- 6) Yuka Nagatsuka, Tomohiko Kiyuna, Rika Kigawa Chie Sano, Sadatoshi Miura and Junta Sugiyama: *Candia tumulicola* sp. nov and *Candida takamatsuzukensis* sp. nov., novel yeast species assignable to the *Candida membranifaciens* clade, isolated from the stone chamber of the Takamatsuzuka tumulus, Int. J. Syst. Evol. Microbiology, 59, 186-194 (2009)
- 7) Kwang-Deuk An, Tomohiko Kiyuna, Rika Kigawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, and Junta Sugiyama: The Identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the sotome chambers in the Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*, Antonie van Leeuwenhoek, 96, 579-592 (2009)

# Carboxylic Acids Productivity of Major Microorganisms Isolated from the Stone Chamber Interior of Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus, Nara Prefecture, Japan

Chie SANO, Miyuki NISHIJIMA\*, Tomohiko KIYUNA\*,  
Rika KIGAWA and Junta SUGIYAMA\*<sup>2</sup>

Takamatsuzuka Tumulus(TT) and Kitora Tumulus(KT) are well known in Japan because of their beautiful mural paintings, which were drawn directly onto calcium carbonate plaster in the stone chamber. Due to catastrophic damage to the murals caused by microorganisms, the stone chamber of TT was dismantled for restoration. On the other hand, the murals of KT were replaced because of the threat of their becoming peeled off. Anamorphic fungi, such as species of *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Acremonium*, and many bacteria, which by metabolism may produce carboxylic acids that might dissolve the thin plaster base of the murals, were isolated from these tumuli. In this study, carboxylic acids productivity of major microorganisms isolated from the stone chamber interiors (14 and 16 from TT and KT respectively; 14 molds, 5 yeasts and 11 bacteria) is reported.

Utilization ability of the major contaminants for glucose, ethanol and iso-propanol respectively was tested and the amount of production of carboxylic acids was compared. Molds isolates were incubated on Czapek broth at 25°C for 6 or 7 days. Bacteria and yeasts strains were cultured at 25°C for 3 or 4 days on a reciprocal shaker. Quantitative analysis of carboxylic acids was performed by Shimadzu LV-10Dp system. By this system, reproducibility of the value of acetic acid concentration of a standard sample is lower than 0.3% of the average, but reproducibility of the value of acetic acid concentration of cultured samples from the same strain of *Fusarium* was around 30~40%. The pH value of filtered samples was also measured.

It was revealed that some microorganisms produce rather heavy acids that decrease the pH value and that some microorganisms can utilize thin ethanol as nutrition. It was also made clear that the acetic acid productivity of *Gluconacetobacter* sp. of 6 strains isolated from different spots in the stone chamber of KT had large variation around 90%; however, all the strains caused large decrease in pH. These results point out that a decrease in pH might cause dissolution of calcium carbonate plaster and that it might help other microorganisms to grow on the plaster.

\*NCIMB Group, TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

\*<sup>2</sup> Chiba Office, TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

